บทบรรณาธิการ

กระบวนการแช่แข็งกับเซลล์สืบพันธุ์

ชุติมา โตพิพัฒน์, พบ.

ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

ในทศวรรษปัจจุบันกระบวนการแช่แข็ง (cryopreservation) ได้กลายเป็นหัวใจสำคัญของเวชศาสตร์การเจริญพันธุ์ (reproductive medicine) เพื่อใช้ในการดูแลและเก็บรักษาเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะต่างๆ ทั้งในพืช สัตว์ รวมถึงมนุษย์ ทั้งๆที่ความรู้ด้านวิทยาศาสตร์สาขานี้เริ่มต้นมีมาตั้งแต่ปลายทศวรรษ 1940 โดยเริ่มต้นจากการที่นักวิทยาศาสตร์มีความพยายามที่จะทำการแช่แข็งเซลล์อสุจิเป็นอันดับแรก แต่การแช่แข็งเซลล์อสุจิกลับไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร อัตราการรอดชีวิตของเซลล์อสุจิอยู่ในระดับต่ำมาก จนกระทั่งภายหลังจากที่มีการค้นพบสารประกอบที่ใช้ป้องกันการบาดเจ็บเสียหายอันเกิดจากกระบวนการแช่แข็ง (cryoprotective agent) ซึ่งถือเป็นการค้นพบครั้งสำคัญที่ทำให้การแช่แข็งประสบความสำเร็จมากขึ้นจนเป็นที่น่าพอใจ[1] ตั้งแต่นั้นมาจึงมีความพยายามที่จะทำการศึกษาวิจัยเพื่อนำกระบวนการแช่แข็งมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ กสิกรรม และอุตสาหกรรมในด้านอื่นๆ

การตั้งธนาคารอสุจิของวัวถือเป็นก้าวแรกที่นำกระบวนการแช่แข็งไปใช้เป็นประโยชน์ในงานด้านกสิกรรม โดยการนำสาร Glycerol มาใช้ช่วยป้องกันการบาดเจ็บเสียหายอันเกิดจากกระบวนการแช่แข็ง ความสำเร็จจากการแช่แข็งเซลล์อสุจิ จึงทำให้มีการนำกระบวนการแช่แข็งนี้ไปใช้กับเซลล์ หรือเนื้อเยื่อชนิดอื่นๆอีก ได้แก่ เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว เซลล์ Islet cell ของตับอ่อน เลนส์ตา ตลอดจนอวัยวะต่างๆ เป็นต้น แม้ความรู้เกี่ยวกับกระบวนการแช่แข็งจะมีมาเป็นเวลากว่าทศวรรษ แต่กลับไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในกรณีอื่นได้อีกนอกจากการแช่แข็งอสุจิจนกระทั่งมีการค้นพบครั้งสำคัญเกี่ยวกับการทำเด็กหลอดแก้ว ในปลายทศวรรษ 1970[2] วิทยาศาสตร์สาขานี้จึงกลับมาได้รับความสนใจอีกครั้ง จนสามารถพัฒนาไปถึงขั้นที่สามารถนำมาใช้ในการแช่แข็งตัวอ่อนที่เหลือจากการทำเด็กหลอดแก้ว รวมถึงการพัฒนาเพื่อนำมาใช้ในการแช่แข็งเซลล์ไข่เช่นในปัจจุบัน

ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับกระบวนการแช่แข็งถือเป็นหัวใจสำคัญที่จะใช้ในการพัฒนาวิธีการแช่แข็งให้เหมาะสมกับเซลล์ หรือเนื้อเยื่อแต่ละชนิด ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องทำความเข้าใจเกี่ยวกับความรู้พื้นฐาน กลไกการบาดเจ็บเสียหายจากกระบวนการแช่แข็ง ตลอดจนวิธีการที่จะใช้ป้องกันการบาดเจ็บเสียหายดังกล่าวในเบื้องต้น

กลไกหลักของการบาดเจ็บเสียหายจากกระบวนการแช่แข็ง เกิดจากสาเหตุสำคัญ 2 ประการคือ การเกิดผลึกน้ำแข็งรูปลิ่มภายในเซลล์ (ice crystal formation) และความเข้มข้นที่สูงขึ้นของสารประกอบภายในเซลล์ (concentrated solutes) นอกจากนี้การใช้สารป้องกันการบาดเจ็บเสียหายจากกระบวนการแช่แข็งเอง ก็สามารถก่อให้เกิดการบาดเจ็บเสียหายต่อเซลล์ได้เช่นเดียวกัน ได้แก่ การบวมน้ำของเซลล์ หรือการหดตัวของเซลล์ ระหว่างขั้นตอนการละลายและการนำสารป้องกันการบาดเจ็บเสียหายออกจากเซลล์ รวมถึงการแตกหักของเซลล์ขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาตรเร็วๆ หรือการบาดเจ็บเสียหายจากผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์[3]

สารป้องกันการบาดเจ็บเสียหายจากกระบวนการแช่แข็ง จะมีกลไกการออกฤทธิ์โดยการป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งรูปลิ่ม และเพื่อลดความเข้มข้นของสารประกอบภายในเซลล์ในขั้นตอนของกระบวนการแช่แข็ง อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่นอีกที่อาจส่งผลกระทบต่อความสำเร็จของการแช่แข็ง อาทิเช่น ชนิดของเซลล์ อัตราการลดอุณหภูมิในขั้นตอนการแช่แข็งหรืออัตราการเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอนการละลาย อัตราการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของน้ำและสารป้องกันการบาดเจ็บเสียหายในกระบวนการแช่แข็งด้วย[4] รวมทั้งการใช้สารป้องกันการบาดเจ็บเสียหายจากกระบวนการแช่แข็งในปริมาณความเข้มข้นที่สูงก็อาจเป็นพิษต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อได้เช่นกัน[3,5]

การเกิดผลึกน้ำแข็งรูปลิ่มภายในเซลล์ (ice crystal formation) ซึ่งเป็นกลไกหลักที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บเสียหายจากกระบวนการแช่แข็ง ผลึกน้ำแข็งแหลมๆที่เกิดขึ้นจะส่งผลให้เซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์และองค์ประกอบภายในเซลล์เกิดการฉีกขาดจนเกิดความเสียหายทางกายภาพ และทำให้เซลล์ตายไปในที่สุด[6] ในทำนองเดียวกันการเกิดผลึกน้ำแข็งรูปลิ่มภายนอกเซลล์ที่มากเกินไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระหว่างที่มีการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ ก็สามารถทำให้เซลล์เกิดการฉีกขาดได้เช่นเดียวกัน[7]

การเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นภายในเซลล์ (concentrated solutes) จากการที่มีการซึมของน้ำออกจากเซลล์ จะส่งผลให้เกิดภาวะสารละลายภายในเซลล์มีความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งภาวะดังกล่าวสามารถอธิบายกลไกการบาดเจ็บเสียหายได้โดยเกิดการรั่วของสารละลายภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์ ส่วนมากจะเป็นกลุ่มอิเลกโตรไลท์ (electrolytes) ดังนั้นเมื่อเข้าสู่กระบวนการละลายก็จะทำให้มีการซึมของน้ำเข้าสู่เซลล์มากเกินไป จนเซลล์เกิดการบวมน้ำและเกิดการแตกของเซลล์ในที่สุด[8,9] นอกจากนี้ภาวะสารละลายภายในเซลล์มีความเข้มข้นสูงขึ้นยังอาจทำให้เซลล์เกิดการหดตัว จนสารประกอบภายในเซลล์เกิดการควบแน่น และเยื่อหุ้มเซลล์ขาดความยืดหยุ่นจนไม่สามารถคืนสภาพปกติได้ในกระบวนการละลาย[5]

กระบวนการแช่แข็งที่เป็นมาตรฐานในปัจจุบันจะแบ่งใหญ่ๆได้เป็น 2 วิธี คือ วิธีการควบคุมการลดอุณหภูมิเพื่อให้กระบวนการแช่แข็งเกิดขึ้นอย่างช้าๆ (slow programmable freezing)[1] และวิธีการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเพื่อให้เกิดการแข็งตัวแบบผลึกแก้วใส (vitrification)[10] โดยกระบวนการแช่แข็งด้วยวิธีการควบคุมการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ จะทำให้มีเวลามากพอที่จะให้น้ำซึมออกจากเซลล์มากที่สุดเพื่อป้องกันไม่ให้มีการสร้างผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ได้ ซึ่งอัตราการลดอุณหภูมิของเซลล์แต่ละชนิด จะขึ้นกับขนาดของเซลล์และความสามารถในการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของน้ำ (water permeability) ในขณะที่วิธีการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเพื่อให้เกิดการแข็งตัวแบบผลึกแก้วใส จะสามารถป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งรูปลิ่มโดยสมบูรณ์ โดยสารป้องกันการบาดเจ็บเสียหายจากกระบวนการแช่แข็งจะทำหน้าที่ลดจุดเยือกแข็งให้ต่ำลง และเพิ่มความหนืดของสารละลายนั้นให้สูงขึ้นประกอบกับการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วทำให้โครงสร้างทางโมเลกุลของผลึกแบบไร้รูปแบบเกิดเป็นผลึกแก้วใสขึ้น เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกระบวนการแช่แข็ง 2 วิธีที่กล่าวข้างต้นพบว่าวิธีการควบคุมการลดอุณหภูมิเพื่อให้กระบวนการแช่แข็งเกิดขึ้นอย่างช้าๆ จะมีโอกาสเกิดการบาดเจ็บเสียหายจากกลไกการเกิดผลึกน้ำแข็งรูปลิ่มได้มากกว่า[11] ขณะที่วิธีการลดอุณหภูมิเพื่อให้เกิดการแข็งตัวอย่างรวดเร็วจะมีโอกาสเกิดการบาดเจ็บเสียหายจากการใช้สารป้องกันการบาดเจ็บจากการแช่แข็งปริมาณความเข้มข้นสูงได้มากกว่าได้เช่นกัน[12]

ปัจจุบันในทางการแพทย์ได้มีการนำวิทยาศาสตร์สาขานี้มาประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลายโดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อช่วยในการดำรงความสามารถในการสืบพันธุ์ของมนุษย์ ตัวอย่างเช่น ใช้ในการแช่แข็งอสุจิ การแช่แข็งตัวอ่อน การแช่แข็งไข่ การแช่แข็งชิ้นเนื้อรังไข่ (ovarian tissue) หรือแม้แต่การแช่แข็งชิ้นเนื้ออัณฑะ (testicular tissue) ดังที่กล่าวข้างต้นอสุจินับว่าเป็นเซลล์ชนิดแรกที่ได้มีความพยายามนำมาเก็บรักษาโดยใช้กระบวนการแช่แข็งจนประสบความสำเร็จ มีรายงานถึงความสำเร็จของการแช่แข็งอสุจิมนุษย์ที่นานที่สุดถึง 21 ปี ดังจะเห็นได้จากประโยชน์ของการแช่แข็งอสุจิมาใช้ได้หลายประการ เช่น ใช้ตั้งธนาคารอสุจิเพื่อที่เก็บรักษาอสุจิบริจาค หรือกรณีที่สามีไม่สามารถมาเก็บน้ำเชื้อสดได้ในวันที่ภรรยามีการตกไข่ รวมถึงเป็นอีกทางเลือกสำหรับผู้ชายที่วางแผนที่จะมีบุตรในอนาคต ที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาโรคบางอย่างซึ่งอาจส่งผลต่อการสร้างอสุจิของอัณฑะ เช่น การผ่าตัด การฉายรังสี และการได้รับยาเคมีบำบัด เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

1. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 1949;164:666.
2. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. Lancet 1978;2:366.
3. Pegg DE. The history and principles of cryopreservation. Semin Reprod Med 2002;20:5-13.
4. Pegg DE. Principles of cryopreservation. Methods Mol Biol 2007;368:39-57.
5. Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. Ilar J 2000;41:187-96.
6. Asahina E, Shimada K, Hisada Y. A stable state of frozen protoplasm with invisible intracellular ice crystals obtained by rapid cooling. Exp Cell Res 1970;59:349-58.
7. Kasai M, Ito K, Edashige K. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. Hum Reprod 2002;17:1863-74.
8. Mazur P, Leibo SP, Chu EH. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. Exp Cell Res 1972;71:345-55.
9. McGann LE, Yang HY, Walterson M. Manifestations of cell damage after freezing and thawing. Cryobiology 1988;25:178-85.
10. Wusteman MC, Pegg DE, Robinson MP, Wang LH, Fitch P. Vitrification media: toxicity, permeability, and dielectric properties. Cryobiology 2002;44:24-37.
11. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. Science 1972;178:411-4.
12. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. Nature 1985;313:573-5.